第39卷 第4期 1996年11月
昆 虫 学 报 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol.39, No.4 Nov., 1996

大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或丹宁混用对棉铃虫中肠蛋白酶和生长率的影响

王琛柱　　钦俊德

(中国科学院动物研究所　北京　100080)

摘要　本文报告了大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)与棉酚、丹宁酸单一和协同作用对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 幼虫中肠蛋白酶活性和生长速率的影响。在离体条件下，STI、棉酚和丹宁酸均对中肠蛋白酶有抑制作用，以 STI 的作用最强。活体试验表明，人工饲料中 0.84%(干重)的 STI 对强碱性类胰蛋白酶活力有显著抑制作用；0.3% 丹宁酸则对弱碱性类胰蛋白酶和总蛋白酶活力有显著抑制作用；0.3% 棉酚对几种蛋白酶活力的影响均不显著。三者均能显著抑制幼虫的生长，而 STI 与棉酚或丹宁酸的协同作用比三者的单独作用更能有效地抑制幼虫的生长发育和中肠蛋白酶活性。

关键词　它感素，棉铃虫，抗虫性

近年来植物蛋白酶抑制剂在害虫防治上显示出一定的应用潜力。Hilder 等将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因导入烟草，转基因幼苗叶片可显著抑制烟草天蛾 *Maduca Sexta* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的取食和生长发育[1]。然而，烟草成株期叶内富含另一类抗虫物质——酚类化合物，当叶组织受伤后，该类物质被多酚氧化酶氧化为醌类化合物，而醌类化合物可与蛋白酶抑制剂结合并使后者丧失抗虫活性[2]。就此有人对转基因烟草的抗虫性在成株期是否会保持表示怀疑。可见，在利用基因工程改良植物抗虫性时，外源与内源抗虫物质的协调性应予以重视。棉酚和丹宁酸是棉花的二种主要抗虫次生性物质[3~4]，棉酚主要存在于棉花体表的色素腺内，丹宁酸则散布于植物组织当中。蛋白酶抑制剂与它们之间是否存在着增效作用或拮抗作用，目前尚未见报道。为了解蛋白酶抑制剂在棉花抗虫性中的利用前途，本文研究了大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)与棉酚或丹宁酸协同作用对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 消化生理和生长发育的影响。

1　材料与方法

1.1　昆虫的饲养和中肠酶液的提取

棉铃虫在 27 ℃、RH 75%、光照时数 14 h 下人工饲养，幼虫人工饲料根据 Bot 的配

1995-04-12 收稿，1995-10-06 收修改稿

方改进[5]。供试幼虫在4℃下解剖，截取中肠及其内含物，以0.15 mol / L NaCl在冰浴内匀浆，于4℃、11 200 g离心15 min，取上清液作为中肠酶液。

1.2 STI、棉酚和丹宁酸对离体中肠蛋白酶的影响

STI、棉酚和丹宁酸分别由Sigma、中国医科院药物所和中国医药公司提供。三种物质分别与中肠酶液在缓冲液中混合，反应10 min后加入蛋白酶的专性底物，测定相应蛋白酶活力的变化。三种物质在反应混合液内的浓度均为5或10 μg / mL。中肠酶液从正常5龄幼虫中提取。试验设置对照，重复3次。

1.3 STI、棉酚和丹宁酸对幼虫中肠蛋白酶活性和生长率的影响

配制6种人工饲料，其内STI、棉酚和丹宁酸的组合及浓度(干重)为：(1)对照；(2)0.84% STI；(3)0.3% 棉酚；(4)0.3% 丹宁酸；(5)0.84% STI+0.3% 棉酚；(6)0.84% STI+0.3%丹宁酸。各抗虫物质浓度依据其在植物体内的含量确定。选择大小一致的5龄幼虫，饥饿10 h后称重，用每种饲料各饲喂10头幼虫，48 h后，取出幼虫，称鲜重，然后解剖，提取中肠酶液，测定蛋白酶活性。重复3次。

根据计算公式 $RGR=(B-A)/[((A+B)\times 2)/T]$，计算相对生长率($RGR$)，其中 A、B、T 分别为幼虫试前鲜重、试后鲜重、取食天数。试验数据统计分析采用随机区组方差分析。

1.4 中肠蛋白酶活力测定

蛋白酶活力均在30℃、最适pH下测定，方法参照Campbell等[6]。各种蛋白酶底物均从Sigma购买。弱碱性类胰蛋白酶活力以P－甲苯磺酰－L－精氨酸甲酯(TAME)为底物，在pH 8.50的Tris缓冲液中测定，在247 nm测光吸收值。强碱性类胰蛋白酶活力以α－N－苯甲酰－DL－精氨酸－P－硝基苯胺(BAPNA)为底物，在pH10.50的甘氨酸缓冲液中测定，在405 nm测光吸收值。类胰凝乳蛋白酶活力以N－苯甲酰－L－酪氨酸乙酯(BTEE)为底物，在pH 8.50的Tris缓冲液中测定，在256 nm测光吸收值。总蛋白酶活性以氨苯磺胺偶氮酪蛋白为底物，在pH 10.50的甘氨酸缓冲液中测定，在366 nm测光吸收值，反应混合物1个吸收单位的变化定义为1个偶氮酪蛋白单位。蛋白质含量以牛血清蛋白为标准蛋白，用Bradford的方法测定[7]。

2 结果

在离体条件下，STI对棉铃虫中肠三种蛋白酶均有很强的抑制作用，尤其对弱碱性和强碱性类胰蛋白酶。棉酚与丹宁酸，除丹宁酸对强碱性类胰蛋白酶有较强的抑制作用外，在其它情况下抑制作用均较弱(表1)。

在三种抗虫物质的给定浓度和组合下，幼虫取食48 h后消化生理的变化和生长的影响见表2，STI和棉酚分别对弱碱性类胰蛋白酶的影响不显著，但二者协同作用可使该酶活性比对照降低34%；丹宁酸可使弱碱性类胰蛋白酶活性降低22%，而与STI的协同作用可降低66%。棉酚和丹宁酸对强碱性类胰蛋白酶无显著影响，STI可使该酶活力

表 1　大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)、棉酚和丹宁酸对离体的棉铃虫幼虫中肠弱碱性类胰蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活力的影响

抗虫素及浓度(μg /mL)		相对活力(%)±*SE*		
		弱碱性类胰蛋白酶	强碱性类胰蛋白酶	类胰凝乳蛋白酶
STI	5	7.96±1.95	4.50±0.71	37.04±8.48
	10	7.21±1.72	2.19±0.28	22.22±11.11
棉酚	5	85.66±5.49	72.14±4.45	75.46±15.61
	10	63.78±9.38	52.04±2.24	50.93±9.75
丹宁酸	5	77.35±8.53	21.81±2.09	92.93±2.18
	10	69.00±9.83	13.51±1.94	79.04±14.81

注：100% 活力为仅有酶与底物在缓冲液中反应测得的活力(对照)，数值小于 100 表示有抑制作用

降低 18%，但棉酚和丹宁酸分别与 STI 配合，对该酶的抑制效果可达 33% 和 55%。STI、棉酚、丹宁酸以及 STI 与棉酚的协同作用对类胰凝乳蛋白酶的影响不显著，但 STI 与丹宁酸的协同作用可使该酶的活性降低 53%。STI 和棉酚分别对总蛋白酶活力影响不显著，丹宁酸可抑制 14%，而 STI 分别与棉酚及丹宁酸的协同作用，可使幼虫中肠总蛋白酶的活性分别降低 30% 和 66%。从三因子对幼虫相对生长率的影响看，STI 与棉酚及丹宁酸的协同作用比三者的单独作用能更有效地抑制幼虫的生长发育。

表 2　棉铃虫取食大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)、棉酚(G)和丹宁酸(T)对其中肠蛋白酶活力和相对生长率(*RGR*)的影响

	弱碱性类胰蛋白酶 水解 TAME μmol /(min · 头)	强碱性类胰蛋白酶 水解 BAPNA μmol /(min · 头)	类胰凝乳蛋白酶 水解 BTEE μmol /(min · 头)	总蛋白酶 偶氮酪蛋白单位 /(min · 头)	相对生长率
对照	8.8395±0.5609 a	0.7588±0.0762 a	1.1295±0.2880 ab	0.5159±0.0305 a	0.5623±0.0205 a
0.84% STI	9.5802±0.9864 a	0.6254±0.0238 b	0.8760±0.2223 bc	0.4701±0.0218 ab	0.5183±0.0267 b
0.3%G	8.2469±0.9639 ab	0.6937±0.0999 ab	0.9451±0.1440 bc	0.4551±0.0195 ab	0.5060±0.0235 b
0.3%T	6.9136±0.8424 bc	0.6918±0.0646 ab	1.3140±0.0692 a	0.4453±0.0487 b	0.5053±0.0212 b
0.84%STI+0.3%G	5.8766±0.3421 c	0.5061±0.0071 c	0.8760±0.2223 bc	0.3636±0.0076 c	0.4645±0.0245 c
0.84%STI+0.3%T	2.9630±0.2963 d	0.3403±0.0905 d	0.5302±0.0400 d	0.1727±0.0358 d	0.4625±0.0243 c

注：1. 数据为平均数 ± 标准差，处理间具有相同字母的为相互差异不显著(Duncan 新复极差检验，$P<0.05$)

2. TAME 表示 P－甲苯磺酰－L－精氨酸甲酯；BAPNA 表示 α－N－苯甲酰－DL－精氨酸－P－硝基苯胺；BTEE 表示 N－苯甲酰－L－酪氨酸乙酯

3　讨论

研究结果表明，STI 与棉酚或丹宁酸协同对棉铃虫幼虫中肠蛋白酶的抑制表现为增

效效应，对幼虫生长的抑制表现为累加效应。植物蛋白酶抑制剂、棉酚和丹宁酸对昆虫的作用机制不完全清楚，但均与抑制昆虫的消化过程有关。蛋白酶抑制剂可引起中肠多种蛋白酶活性发生变化，其中可诱导虫体对某些消化酶的超量合成，从而引起营养损失和消化失调[8]。棉酚对海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的作用机制研究表明棉酚有以下作用：(1)抑制蛋白酶活性和脂类的过氧化过程；(2)增加微粒体的 N－脱甲基作用；(3)低浓度刺激线粒体的 ATP 酶活性；高浓度则有抑制作用[9]。丹宁酸的作用机制，一般认为它可能通过与消化酶或食物中的蛋白质结合成复合体，降低昆虫对营养物的消化利用[10]，最近的研究结果表明，丹宁酸的营养拮抗效应可能是由于它的毒性和抑制取食作用[11~12]。可见三者的作用方式有相似之处，但又有不同的机制。若外源蛋白酶抑制剂基因能转入具有较高棉酚和(或)丹宁酸含量的棉花植株，有望得到对棉铃虫高抗的棉花品种。不过，本实验结果是模拟自然情况，人为控制人工饲料内的化学组分及其含量获得的。由于植物是活的有机体，所含化学物质的种类、分布及存在方式与人工饲料内的有很大差异，因此，这些抗虫化学因素在植物自然状态下关系如何有待进一步研究。

参 考 文 献

1 Hilder V A, Gatehouse A M R *et al.* A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 1987, **300**: 160～163

2 Felton G W, Broadway R M *et al.* Inactivation of protease inhibitor activity by plant－derived quinones: Complications for host－plant resistance against Noctuid herbivores. J. Insect Physiol. 1989, **12**: 981～990

3 Hedin P A, Jenkings J N *et al.* Multiple factors in cotton contributing to resistance to the tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. In: Hedin P A (ed.) Plant Resistance to Insects. American Chemical Society, Washington, D. C. 1983, 79～94

4 王琛柱，张青文等. 棉酚和可水解单宁含量与棉花抗棉铃虫的关系. 北京农业大学学报，1993，**19**(增)：66～70

5 Bot J. Rearing *Heliothis armigera* (Hübner) and *Prodenia litura* F. on an artificial diet. S. Afr. J. Agri. Sci. 1966, **9**: 538～539

6 Campbell F C, Houseman J G *et al.* A preliminary characterization of alkaline digestive proteases in the posterior midgut of face fly *Musca autumnalis* De Ceer. Can. J. Zool. 1987, **65**: 635～639

7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein－dye binding. Analyt. Biochem. 1976, **72**: 248～254

8 Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinas inhibitors: Mechanisms of action and effect on the growth and physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 1986, **32**: 827～834

9 El－Sebae A H, Sherby S I *et al.* J. Environ. Sci. Health, 1981, B16: 167

10 Feeny P P. Plant apparency and chemical defense. Rec. Adv. Phytochem. 1976, **10**: 1～40

11 Martin J S, Martin M M *et al.* Failure of tannic acid to inhibit digestion or reduce digestibility of plant protein in gut fluids of insect herbivores: Implications for theories of plant defense. J. Chem. Ecol. 1987, **13**: 605～621

12 Blytt H J, Guscar T K *et al.* Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. J. Chem. Ecol. 1988, **14**: 145～146

EFFECT OF SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR, GOSSYPOL AND TANNIC ACID ON THE MIDGUT PROTEASE ACTIVITIES AND GROWTH OF *HELICOVERPA ARMIGERA* LARVAE

Wang Chenzhu Qin Junde

(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing* 100080)

Abstract The effects of soybean trypsin inhibitor (STI), gossypol, and tannic acid on the growth and digestive physiology of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) were studied. Each of three agents inhibited larval midgut proteolytic activity *in vitro*; STI was the most effective. When incorporated into an artificial diet, 0.84% (dry weight) STI significantly reduced the high alkaline trypsin-like enzyme activity by 18%; 0.3% tannic acid significantly decreased the low alkaline trypsin-like enzyme activity and total proteolytic activity by 22% and 18% respectively; and 0.3% gossypol had no significant effect on proteolysis. All the three agents remarkably suppressed the growth of larvae. Co-occurrences of STI and gossypol or tannic acid respectively declined the low alkaline trypsin-like enzyme activity by 34% and 66%, the high alkaline trypsin-like enzyme activity by 33% and 55%, and the total proteolytic activity by 30% and 66%. Co-occurrence of STI and tannic acid also reduced chymotrypsin-like enzyme activity by 53%. Both gossypol and tannic acid potentiated the larval growth inhibitory activity of STI, and this implicates the protease inhibitor engineered into the cotton with high gossypol and / or tannin content may achieve greater protection against the cotton bollworm.

Key words Soybean trypsin inhibitor, gossypol, tannic acid, *Helicoverpa armigera* (Hübner), protease